



TITLE:

計画12-2 ニホンザルにおけるスギ花粉特異的IgE抗体測定法の確立(III 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

今岡, 浩一; 阪口, 雅弘; 井上, 栄

CITATION:

今岡, 浩一 ...[et al]. 計画12-2 ニホンザルにおけるスギ花粉特異的IgE抗体測定法の確立(III 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1991, 21: 74-75

ISSUE DATE:

1991-09-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164236>

RIGHT:

ターンは、新世界ザルと旧世界ザルとで0.12の相間距離で変異していた。しかし、新世界ザルおよび旧世界ザルのそれぞれの種間では全脂質でみられたほどに大きな変異を示さなかった。また胎盤中の主要な糖脂質のガングリオシド G-1, G-2, G-3, G-4 は旧世界ザルと新世界ザルで分布に大きな変異が観察された。旧世界ザルで G-1, G-2 相当するガングリオシドが欠損しているものもある。

これらの結果は、脂肪酸のパターンにより種内、種間の変異を定量化できることを示している。

課 題 12

計画12-1:

ニホンザルのスギ花粉症に関する研究

橋本道子(日獣畜大・野生動物)
峰澤 満(農水省・農業試験場)

ニホンザルのスギ花粉症について。疫学調査、および末梢血中の好塩基球を用いた実験を行なった。

1. 全国の動物園・野猿公苑への自然発症に関するアンケート調査では、今年度は14ヶ所から、花粉症様の症状を示すサルが居るとの回答が寄せられた。そのうち5ヶ所で、捕獲・採血を実施し、スギ特異的 IgE 抗体を調べた。

2. 即時型アレルギー反応に重要な役割を担う細胞として、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターを遊離する、組織中の肥満細胞 (mast cell) や末梢血中の好塩基球 (basophil) が知られている。これらのアレルギー担当細胞について、血中または組織中の組成、分布特性、細胞1個当りの抗原特異的なヒスタミン遊離能を明らかにすることで、アレルギー反応に関する細胞レベルでの種間比較が可能となる。既に、好塩基球の白血球分率については、白血球画分を Microcell counter と May-Gruenwald/Giemsa 染色した塗抹標本を用いて検討し、ニホンザルの好塩基球分率は、ヒトのそれに比べ6分の1で、約0.07%の分率であることを明らかにした。現在、抗原特異的ヒスタミン遊離能等、好塩基球の機能性について解析している。

計画12-2:

ニホンザルにおけるスギ花粉特異的 IgE 抗体測定法の確立

今岡浩一・阪口雅弘・井上 栄
(国立公衆衛生院)

サルにおけるスギ花粉症の実態を把握するため、また、サルの花粉症がヒトのモデルになりうるか検討するために、サル血清中のスギ特異的 IgE 抗体の測定を試みた。しかし、サル IgE に対する抗体試薬はまだなく、抗ヒト IgE を代用したがサル IgE に対する特異性が低いため、効果的なツールとならなかった。そこで、我々はサル IgE に対する単クローン抗体を作出することにし、まず、免疫原に用いるサル IgE の精製を以下のような手順で行ったので報告する。なお、IgE は、血清中に IgG の約 1/10000 (約 1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の割合で存在する。

- 1) サル血清に硫酸アンモニウムを33%になるように加え、その上清に対して、50%になるように硫酸を加え、IgG を減少させた沈殿を集めた。この方法で血清680mlを処理した。
- 2) IgG 除去のため、この分画に対して、プロテインGを処理し、吸着しない部分を集めた。
- 3) 抗ヒト IgG アフィニティーカラムを作成して、上記分画をカラムに吸着後、酸により IgE を溶出した。この反応を2回繰り返し、濃縮器を用いて、IgE を主成分とする分画6mlを得た。しかし、まだ IgG・IgM・IgA がかなり混入していた。
- 4) IgA 除去のため、抗ヒト IgA アフィニティーカラムを作製し、上記分画を処理し、吸着しない部分を集めた。この処理を2回繰り返した。
- 5) さらに混入している IgG を除去するため、プロテインGを処理した。
- 6) セファクリル S-300 のカラムを用いて、ゲル濾過を行った。各フラクションについて、タンパク量と、IgG・IgE・IgA・IgM の活性を測定した。その結果、タンパクのピークは3か所に認められ、それぞれ、IgM・IgE・IgG であった。また、IgE のピークにおける IgG・IgA・IgM の活性は低かった。
- 7) そこで、上記の IgE のピーク (収量は約700 μg) を集め、抗サル IgE 単クローン抗体作出のための免疫原として用いることにした。

現在、抗サル IgE 単クローン抗体を作出中である。

計画12-3:

各種サル免疫グロブリンの精製と特異抗血清の作成

藤本浩二 (社団法人・予防衛生協会)
寺尾恵治 (予研・筑波霊長類センター)
中井 裕 (茨城大・農)

サル類をアレルギー研究のモデル動物として開発するに当たり、これらサル類の各種免疫グロブリンに対する特異抗血清を作製しておくことは必須な条件となる。本研究は、アレルギー研究に多用されているマカカ属サルの各免疫グロブリンクラス (IgG, IgA, IgM, IgE) に特異的な抗血清あるいはモノクローナル抗体を作製することを目的とする。

本年度は、IgG, IgA, IgM については、カニクイザルからこれらを分離精製し、これをウサギに免疫して特異抗血清を作製した。IgE については、ニホンザルのプール血清から分離された阻精製分画をマウスに免疫し、モノクローナル抗体の作製を進めた。

IgG はプールした成体血清から硫酸塩析法および DEAE-セルロース、セファクリル S-300 によるクロマトグラフィーを組合せて精製した。IgA, IgM は抗ヒト IgA あるいは抗ヒト IgM を conjugate したセファロース 4B とセファクリル S-300 によるクロマトグラフィーを組合せて精製した。抗血清は精製した免疫グロブリンを完全アジュバントと共にウサギに免疫して作製した。抗 IgA 血清については、臍帯血清蛋白を conjugate したセファロース 4B で吸収した後特異抗血清とした。抗 IgM 血清は、成体プール血清からセファクリル S-300 ゲル濾過での最初の分画を除いた分画を conjugate したセファロース 4B で吸収した。作製した抗血清のクラス特異性は免疫電気泳動で確認した。また本抗血清を用いてのオクタロニーテストでは、カニクイザル、ニホンザル、アカゲザルの血清による沈降線はよく融合し、これらの抗血清が3種のサルに対し、高い種特異性を持つことが明らかとなった。なおこれらの抗血清から分離した抗体には酵素あるいは蛍光色素をラベルし、各種のアレルギー反応の測定に

利用する。

ニホンザル由来の IgE については、阻精製分画であること、回収蛋白量が少いことを考え合せて、マウスに免疫し、常法に従いモノクローナル抗体の作製を進めている。

計画12-4:

スギ花粉症ニホンザルの疾患モデルの作出

横田 明 (名古屋市立東市民病院)

本研究ではニホンザルにスギ花粉抗原による態動感作を行い、花粉症の実験モデルの作出を試みた。

宮島群由来の成獣ニホンザルを用いて部分精製標品のスギ花粉抗原による実験的感作条件を検討した。1群 (2頭) にスギ抗原とアジュバント効果のあるアルムの混合物を4週毎に6回皮内投与した。他の群 (2頭) にはスギ抗原のみを同様に投与し、両群の感作状態は、スギ特異的 IgE 抗体の産生及び皮内アレルギー反応性を指標にしてモニターした。感作はスギ抗原+アルムを投与した群にのみ認められ、スギ抗原だけを投与した群では特異的 IgE 抗体産生や皮内アレルギー反応は認められなかった。この結果より、スギ花粉抗原による実験的感作条件として、花粉抗原に加えアジュバント因子の共存が不可欠である事が明らかになった。

課 題 13

計画13-1:

霊長類大脳皮質におけるドコサヘキサエン酸の蓄積とその生合成能について

藤本健四郎・金沢文子 (東北大)

膜脂質に多く存在するドコサヘキサエン酸 (DHA) は、生体膜の機能を維持する上で重要な役目を持つと考えられており、特に神経系で含有量が高い。神経系の形成期である出生の前後には DNA の著しい蓄積が観察される。生体内での供給源は主として肝臓であるが、合成系の確立していない胎児や新生児のころには、外部からの補給に依存する度合いが大きい。本研究においても、ニホンザルを用いた実験で、新生動物の脳における DHA 合成能が低いことを確認した。そこで、